



PCT/JP00/02023

09/937739

30.03.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/02023

EJU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 3月31日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第091408号

出願人

Applicant(s):

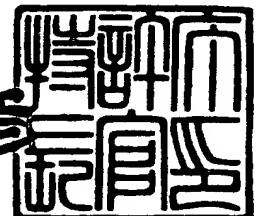
学校法人慶應義塾

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 5月12日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3032553

【書類名】 特許願

【整理番号】 KUV-101

【提出日】 平成11年 3月31日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区六番町 6-1-904

【氏名】 天谷雅行

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市保土ヶ谷区峰岡町 2-217-8

【氏名】 西川武二

【発明者】

【住所又は居所】 東京都江戸川区南篠崎町 2-129-602

【氏名】 鈴木春巳

【発明者】

【住所又は居所】 東京都練馬区下石神井 6-12-3

【氏名】 小安重夫

【特許出願人】

【識別番号】 598121341

【氏名又は名称】 学校法人慶應義塾

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】

21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】

明細書 1

【物件名】

図面 1

【物件名】

要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 自己免疫疾患モデル動物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の産生または T細胞の活性化により、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物。

【請求項 2】 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を抗原タンパク質で免疫し、その脾細胞が移植されている、請求項 1 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 3】 脾細胞の移植が、免疫不全非ヒト哺乳動物に対して行われている、請求項 2 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 4】 免疫不全非ヒト哺乳動物が、RAG2遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物である、請求項 3 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 5】 自己免疫疾患が尋常性天疱瘡である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 6】 抗原タンパク質がデスモグレイン 3 タンパク質である、請求項 5 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 7】 げっ歯類である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 8】 マウスである、請求項 7 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 9】 自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の産生または T細胞の活性化により、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を自己免疫疾患の抗原タンパク質で免疫する工程、

(b) 該非ヒト哺乳動物から脾細胞を調製する工程、および

(c) 該脾細胞を抗原タンパク質を有する非ヒト哺乳動物に移植する工程、を含む方法。

【請求項 10】 脾細胞の移植が、免疫不全非ヒト哺乳動物に対して行われている、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】 免疫不全非ヒト哺乳動物が、RAG2遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物である、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】 自己免疫疾患が尋常性天疱瘡である、請求項 9 から 1 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3】 抗原タンパク質がデスモグレイン 3 タンパク質である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】 非ヒト哺乳動物がげっ歯類である、請求項 9 から 1 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5】 げっ歯類がマウスである、請求項 1 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、自己免疫疾患のモデル動物およびその作製方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

尋常性天疱瘡 (pemphigus vulgaris; PV) は、時として致命的となる皮膚及び粘膜の自己免疫水疱形成疾患であり、組織学的には表皮内の水疱形成により特徴付けられ、免疫病理学的にはケラチノサイトの細胞表面に対する IgG 自己抗体により特徴付けられる (Stanley, J.R. Pemphigus. In Dermatology in General Medicine. I.M. Freedberg, A. Z. Eisen, K. Wolff, K.F. Austen, L.A. Goldsmith, S.I. Katz, and T.B. Fitzpatrick, eds. McGraw-Hill, New York, 654-666 (1998))。臨床的には、尋常性天疱瘡患者は、広範な弛緩性の水疱及びびらんを示す。これらは、あらゆる重層扁平上皮に生じうる。適当な治療を行わなければ、広範囲の皮膚に生じた病巣が体液の病出又は二次的な細菌感染を引き起こすため、尋常性天疱瘡は致命的となることもある。コルチコステロイドの全身投与及び免疫抑制療法を用いることにより、天疱瘡の予後は改善されているが、治療の合併症による死亡のため、死亡率は依然としてかなり高い。

【0 0 0 3】

尋常性天疱瘡の標的抗原は、最初、ケラチノサイト抽出物の免疫沈降により、

130kDの糖タンパク質として同定された (Stanley, J.R. et al., J. Clin. Invest. 70:281-288 (1982); Stanley, J.R. et al., J. Clin. Invest. 74:313-320 (1984))。その後、尋常性天疱瘡抗原に特異的なアフィニティ精製自己抗体を用いてヒト・ケラチノサイト発現ライブラリーを免疫スクリーニングすることにより、尋常性天疱瘡抗原のcDNAが単離された (Amagai, M. et al., Cell 67:869-877 (1991))。塩基配列の解析により、尋常性天疱瘡抗原は、細胞間接着分子のカドヘリン・スーパー遺伝子ファミリーに属することが示された。尋常性天疱瘡抗原は、デスモソームの膜タンパク質であり (Karpati, S. et al., J. Cell Biol. 122:409-415 (1993))、デスモグレイン3 (desmoglein3/Dsg3) と名付けられた (Amagai, M. Adv. Dermatol. 11:319-352 (1996))。

【0004】

Dsg3タンパク質に対するIgG自己抗体が尋常性天疱瘡の病因的役割を示す証拠は多数存在する。第一に、経時的な疾患の活性が、血中抗体力価と相関していることが、間接蛍光抗体法 (Sams Jr, W.M. & Jordon, R.E., Br. J. Dermatol. 84:7-13 (1971)) 又はELISA (Ishii, K., et al., J. Immunol. 159:2010-2017 (1997); Amagai, M., et al., Br. J. Dermatol. 140:351-357 (1999)) により報告されている。第二に、尋常性天疱瘡を患う母親の新生児は、胎盤を介して移行した母親由来のIgGのために一時的に疾患を有する (Merlob, P. et al., Pediatrics 78:1102-1105 (1986))。母親由来のIgGが異化されるにつれ、症状は軽快する。第三に、尋常性天疱瘡患者由来のIgGは、組織培養された皮膚において、補体又は炎症細胞なしに水疱形成を誘導することができる (Schiltz, J.R., & Michel, B., J. Invest. Dermatol. 67:254-260 (1976); Hashimoto, K. et al., J. Exp. Med. 157:259-272 (1983))。第四に、患者の血清由来のIgGを新生マウスに受動移入すると、典型的な組織学的所見を伴う表皮内水疱形成が起こる (Anhalt, G.J. et al., N. Engl. J. Med. 306:1189-1196 (1982))。第五に、患者の血清を、細胞外ドメインからなる組換えDsg3タンパク質 (rDsg3) を用いて免疫吸収除去すると、血清の病原性が除去され、新生マウスにおける水疱形成が阻害される (Amagai, M. et al., J. Clin. Invest. 94:59-67 (1994))。最後に、rDsg3でアフィニティ精製された抗体は、病原性を有し、新生仔マウスにお

いて尋常性天疱瘡の組織学的所見を伴う水疱を形成させる (Amagai, M. et al., J. Clin. Invest. 90:919-926 (1992); Amagai, M. et al., J. Clin. Invest. 102:775-782 (1998))。

【0005】

これらの研究から、尋常性天疱瘡は、特に自己抗体生成後の過程に関しては、最もよく特徴が決定された自己免疫疾患の一つとなっている。従って、尋常性天疱瘡は、現在では、自己抗体産生又は自己寛容の破壊の細胞メカニズムを研究するため、また、疾患特異的な治療法を開発するための、組織特異的自己免疫疾患の良い疾患モデルである。これらの目標に達するための第一段階として、尋常性天疱瘡の活性疾患動物モデルの開発が必要である。

【0006】

実験的自己免疫疾患動物モデルの大部分は、様々なアジュバントを用いて自己抗原を繰り返し注射することにより作製されている。しかし、重症筋無力症の場合のように、アセチルコリン・レセプター (T.カリフォルニカ (T.californica)) で免疫されたマウスに活性な疾患が発生する頻度は系統により極めて異なるため、この方法は、非常に経験に頼ったものである (Berman, P.W. et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 377:237-57 (1981))。

【0007】

過去に、重症複合免疫不全 (SCID) マウスを尋常性天疱瘡患者由来のPBMCで再構築することにより、尋常性天疱瘡のインビボ実験モデルが開発された (Juhász, I. et al., J. Clin. Invest. 92:2401-7 (1993))。このモデルでは、患者由来のリンパ球が低力価の血中自己抗体を産生したが、マウス皮膚にヒトIgG沈着を伴う自発的な表皮内水疱が見られることは稀であった。ヒトの皮膚をSCIDマウスに移植した場合には、移植された皮膚に尋常性天疱瘡様の水疱が見られたが、このモデルにおける水疱発生の原因は、ヒトのPBMC及び皮膚の組織不適合による炎症反応である可能性も否定できていない。このように、確実な尋常性天疱瘡の活性疾患モデルは存在していなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、自己免疫疾患のモデル動物およびその作製方法を提供する。より詳しくは、自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応するT細胞やB細胞の活性化とそれに伴う自己抗体の安定的な産生が誘導され、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物およびその作製方法を提供する。好ましい態様において、該モデル動物は、自己免疫疾患の抗原タンパク質に対する抗体を産生するB細胞、および/または抗原タンパク質に反応するT細胞を含む脾細胞の移植により作製される。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、従来一般的に用いられてきた反復注射法を採用して、マウス内における自己抗体の産生を試みた。具体的には、3系統のマウス、BALB/c (H-2^d)、C3H/HeJ (H-2^k)、及びC57BL/6N (H-2^b) をヒト又はマウスのDsg3タンパク質で免疫した。初回免疫においては完全フロイント・アジュバントを用い、その後は、不完全フロイント・アジュバントを用いて3又は7回追加免疫を行った。しかしながら、この方法では、いずれのマウスもマウスDsg3タンパク質に反応することができる抗体を産生せず(表1)、尋常性天疱瘡の表現型を全く発現しなかった。

【0010】

この結果に基づき、本発明者らは、マウス体内において病原性抗体が産生されないのは、Dsg3タンパク質に対する自己寛容のためであるとの仮説をたてた。この仮説に基づけば、遺伝子ターゲティング技術により作製したDsg3欠損マウスは発生段階で免疫系がDsg3タンパク質に曝されず、Dsg3タンパク質に対する自己寛容を獲得していないと考えられる。

【0011】

本発明者らは、この仮説を証明するために、Dsg3欠損マウスに対してDsg3タンパク質を免疫して、Dsg3タンパク質に対する抗体を産生するか否かの検討を行った。その結果、Dsg3タンパク質の免疫により、DSG3遺伝子をホモで欠損しているDSG3^{-/-}マウスでは、DSG3遺伝子をヘテロで欠損しているDSG3^{+/-}マウスと比較して、はるかに効率的な抗体の産生が検出された(図1A)。また、DSG3^{-/-}マウスにおいて産生された抗体は、ケラチノサイト上のマウスDsg3タンパク質に結合す

ることができたが、DSG3+/-マウスの抗体は結合できなかった（図1B）。即ち、DSG3-/-マウスにおいては、DSG3タンパク質に対する自己寛容が成立しておらず、産生された抗体がマウスDsg3タンパク質を抗原として認識することが判明した。

【0012】

そこで、本発明者らは、次に、Dsg3タンパク質で免疫したDSG3-/-マウスから脾細胞（DSG3タンパク質に対する抗体の産生能を有する）を取り出し、これをRAG2-/-免疫不全マウスに養子移入して、該マウス内でのDsg3タンパク質に対する抗体の産生および尋常性天疱瘡の表現型の発現を試みた。RAG2-/-マウスは、Dsg3タンパク質を発現しているが、T細胞レセプター又は免疫グロブリンの遺伝子を再編成することができないため、これらのマウスには成熟T又はB細胞が存在しない（即ち、免疫不全となっている）。

【0013】

その結果、DSG3-/-マウスの脾細胞が移植されたRAG2-/-マウスでは、脾細胞に含まれるDsg3タンパク質に特異的なリンパ球が内因性のDsg3タンパク質に結合し、これによりDsg3タンパク質に対する抗体が永続的に産生された（図2A）。また、免疫されたDSG3-/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスは、DSG3-/-マウスとほぼ同一の表現型を示すことが見出された（Koch, P.J., et al., J. Cell Sci. 111:2529-2537 (1998); Koch, P.J., et al., J. Cell Biol. 137:1091-1102 (1997)）。いずれのマウスも、粘膜のびらん性損傷、皮膚の基底上棘融解、休止期毛の消失を示した（図3）。DSG3-/-脾細胞の養子移入によりRAG2-/-受容マウスにおいてほぼ同一の表現型が再現したことは、産生された抗体が特異的かつ病原性であることを証明するものである。

【0014】

この抗体の特異性は、Dsg2タンパク質を発現している他の単層上皮（Schafer, S. et al., Exp. Cell Res. 211:391-9 (1994)）、又はDsg1タンパク質を発現している表皮の上部（図3G）（Amagai, M. et al., J. Invest. Dermatol. 106:351-355 (1996)）には、インビボの沈着が見られないことから裏付けられる。

【0015】

このように、本発明は、天疱瘡の最初の疾患マウスモデルおよびその作製方法

を提供するものである。本発明の方法は、その性質上、自己抗体の標的が同定されている他の自己免疫疾患のモデル動物の作製に広く応用することが可能である。

【0016】

従って、本発明は、自己免疫疾患のモデル動物およびその作製方法に関し、より具体的には、

- (1) 自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の産生またはT細胞の活性化により、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物、
- (2) 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を抗原タンパク質で免疫し、その脾細胞が移植されている、(1)に記載の非ヒト哺乳動物、
- (3) 脾細胞の移植が、免疫不全非ヒト哺乳動物に対して行われている、(2)に記載の非ヒト哺乳動物、
- (4) 免疫不全非ヒト哺乳動物が、RAG2遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物である、(3)に記載の非ヒト哺乳動物、
- (5) 自己免疫疾患が尋常性天疱瘡である、(1)から(4)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物、
- (6) 抗原タンパク質がデスモグレイン3タンパク質である、(5)に記載の非ヒト哺乳動物、
- (7) げっ歯類である、(1)から(6)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) マウスである、(7)に記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) 自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の産生またはT細胞の活性化により、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物の作製方法であって、
 - (a) 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を自己免疫疾患の抗原タンパク質で免疫する工程、
 - (b) 該非ヒト哺乳動物から脾細胞を調製する工程、および
 - (c) 該脾細胞を抗原タンパク質を有する非ヒト哺乳動物に移植する工程、を含む方法、
- (10) 脾細胞の移植が、免疫不全非ヒト哺乳動物に対して行われている、(

9) に記載の方法、

(1 1) 免疫不全非ヒト哺乳動物が、RAG2遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物である、(1 0) に記載の方法、

(1 2) 自己免疫疾患が尋常性天疱瘡である、(9) から(1 1) のいずれかに記載の方法、

(1 3) 抗原タンパク質がデスモグレイン3タンパク質である、(1 2) に記載の方法、

(1 4) 非ヒト哺乳動物がげっ歯類である、(9) から(1 3) のいずれかに記載の方法、

(1 5) げっ歯類がマウスである、(1 4) に記載の方法、に関する。

【0 0 1 7】

【発明の実施の形態】

本発明のモデル動物は、自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の安定的な産生、またはT細胞の持続的な活性化により、自己免疫疾患の表現型を示すことができる。

【0 0 1 8】

本発明においてモデル動物の作製を行うための対象疾患としては、自己免疫疾患であれば特に制限はない。自己免疫疾患としては、例えば、尋常性天疱瘡、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、バセドー病、橋本病、グットパスチャー症候群、自己免疫性糖尿病、多発性硬化症などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0 0 1 9】

モデル動物の作製に用いられる動物は、好ましくは非ヒト哺乳動物である。非ヒト哺乳動物としては、遺伝子欠損動物を作製しうるものであれば制限はない。好適な動物としては、げっ歯類、例えば、マウスが挙げられる。

【0 0 2 0】

本発明のモデル動物は、抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を自己免疫疾患の抗原タンパク質で免疫し、その脾細胞を摘出し、これを該抗原タンパク質を有する他の非ヒト哺乳動物に移植することにより作製することができる。

【0021】

抗原遺伝子を欠損した動物の作製は、当業者に公知の方法で行うことができる。欠損させる抗原遺伝子としては、例えば、自己免疫疾患が尋常性天疱瘡であればDSG3遺伝子、重症筋無力症であればアセチルコリン受容体遺伝子、バセドー病や橋本病であればTSH受容体遺伝子、グットパスチャー症候群であればIV型コラーゲン遺伝子、多発性硬化症であればミエリン塩基性蛋白質遺伝子などが挙げられるが、これら例示したものに制限されない。

【0022】

脾細胞を調製するための動物（ドナー）と脾細胞の移植を受ける動物（レシピエント）は、移入される脾細胞由来のリンパ球がレシピエントの組織を破壊するGVHDが発症しないようにするために、同種であり、遺伝子背景が同じであることを要する。

【0023】

また、レシピエントは、移入された脾細胞由来のリンパ球を拒絶しないようにするために、免疫不全であることが好ましい。免疫不全動物としては、RAG2遺伝子が欠損した動物以外に、例えば、SCIDマウス、ヌードマウスを用いることも考えられる。また、MHCノックアウトマウスや共通 γ 鎖ノックアウトマウスなどを用いることも考えられるが、これらに制限されない。

【0024】

ドナーの抗原タンパク質での免疫、ドナーからの脾細胞の調製、およびレシピエントへの脾細胞の移植は、例えば、実施例に記載の方法により行うことができる。

【0025】

調製された本発明のモデル動物は、自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の安定的な産生、またはT細胞の持続的な活性化により、自己免疫疾患の表現型を示すことができる。尋常性天疱瘡のモデル動物においては、主要な表現型として体重減少及び可逆的な脱毛などを示す。また、尋常性天疱瘡以外の自己免疫疾患では、重症筋無力症では筋力低下、自己免疫性溶血性貧血では貧血、バセドー病では甲状腺機能亢進、橋本病では甲状腺機能低下、グットパスチャー症候

群では腎障害や肺障害、自己免疫性糖尿病では糖尿、多発性硬化症では神経麻痺などの表現型を示すと考えられる。

【0026】

これらのモデル動物は、自己免疫疾患の治療効果を検討したい所望の化合物を投与し、その表現型を観察することにより、該疾患に対する治療薬や治療法の開発に用いることができる。特に、本実施例において作製された尋常性天疱瘡のモデルマウスは、その主要な表現型が体重減少及び可逆的な脱毛であり、また表現型が6か月以上に亘って持続するため、該マウスを屠殺することなく観察してそれぞれの治療薬や治療法の有効性を容易かつ客観的に評価することが可能である。また、これらのモデルマウスは、抗原タンパク質に対する抗体産生の細胞メカニズムを解明する上でも非常に有用である。

【0027】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0028】

【実施例1】 組換えマウスDsg3タンパク質の製造

マウスDsg3の全細胞外ドメインをコードするcDNA (Genbank U86016) を、適当なプライマー (5'-CCGAGATCTCCTATAAATATGACCTGCCTCTTCCCTAGA-3' / 配列番号: 1、5'-CGGGTCGACCCTCCAGGATGACTCCCCATA-3' / 配列番号: 2) を用いて、マウスDsg3 cDNAを含むファージクローン (Dr. Jouni Uittoより譲り受けた) を鋳型としてPCR増幅し、増幅断片をpEVmod-Dsg3-Hisベクター (Ishii, K., et al., J. Immunol. 159:2010-2017 (1997)) 中のヒトDsg3 cDNAと入れかえることによりサブクローニングした (pEVmod-mDsg3-His)。組換えバキュロタンパク質、マウスrDsg3は、以前の記載のようにして調製した (Amagai, M. et al., J. Clin. Invest. 94:59-67 (1994); Amagai, M. et al., J. Invest. Dermatol. 104:895-901 (1995))。

【0029】

【実施例2】 DSG3+/+野生型マウスにおけるマウスDsg3タンパク質の免疫

まず、ヒト又はマウスのrDsg3の免疫により、様々な野生型マウス系統においてDsg3タンパク質に対する抗体を産生させようと試みた(表1)。

【0030】

マウスを、完全フロイント・アジュバント(CFA)を用いて、5 μ gのマウス又はヒトの精製rDsg3を腹腔内注射することにより感作し、その後毎週、3回または7回、不完全フロイント・アジュバント(IFA)を用いて、マウス又はヒトのrDsg3で追加免疫した。抗体産生は、それぞれの追加免疫の3日後にELISAにより試験した。

【0031】

マウスにおけるマウスDsg3タンパク質(mDsg3)またはヒトDsg3タンパク質(hDsg3)に対する血中IgGのELISAによる測定は、マウスまたはヒトrDsg3をコーティング用抗原として用いた。具体的に説明すると、マイクロタイター96穴プレートを、4℃で一晩、100 μ lの5 μ g/mlの精製マウスまたはヒトrDsg3でコーティングした。全ての血清試料を50から5,000倍に希釈し、室温で1時間、96穴ELISAプレート上でインキュベートした。ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG抗体(MBL, Nagoya, Japan)と共に室温で1時間インキュベートした後、1mMのテトラメチルベンジジンをペルオキシダーゼの基質として用い、発色させた(Ishii K et al., J Immunol 159: 2010-2017, 1997, Amagai M et al., Br J Dermatol 140:351-357, 1999)。各試料をデュプリケートで分析した。マウスrDsg3で免疫されたDsg3^{-/-}マウスから得られた単一の血清試料を陽性対照として用い、免疫されていないマウス由来の血清を陰性対照として用いた。ELISAスコアは、[(試料のOD-陰性対照のOD) / (陽性対照のOD-陰性対照のOD) × 100]で計算される指数として得た(表1)。

【0032】

さらに、Dsg3タンパク質に対する抗体産生を、培養ケラチノサイトの免疫蛍光染色により試験した。マウス・ケラチノサイト細胞株PAM212(Yuspa, S.H. et al., Cancer Res. 40:4694-4703 (1980))又はヒト・ケラチノサイト細胞株KU8(Tsukamoto, T., Keio J. Med. 38:277-293 (1989))を、37℃で、5%CO₂を含む加湿空気中で、30分間、10%FCSを含むDMEMで20倍に希釈したマウス血清試料と

共にインキュベートした。次に、PBS(-)で洗浄した後、 -20°C で20分間、細胞を100%メタノールで固定化し、フルオレセイン・イソチオシアネート (FITC) 結合ヤギ抗マウスIgG抗体 (DAKO, Copenhagen, Denmark) と共に室温で30分間インキュベートした。染色は、蛍光顕微鏡 (Nikon, Eclipse E800) で観察した。

【0033】

C57BL/6Nマウス又はBALB/cマウスを、完全フロイント・アジュバント、次に不完全フロイント・アジュバントを用いてヒトrDsg3で免疫した場合、これらのマウスは、ヒトrDsg3とのみ反応し、マウスrDsg3とは反応しないIgGを産生することが、ELISA及び免疫蛍光染色により決定された。C3H/HeJマウスのみがELISAでマウスrDsg3に対する弱い交叉反応性を示すIgGを産生した。これらの3系統のマウスをマウスrDsg3で免疫した場合には、いずれのマウスも、用いた3つの方法 (ELISA、間接蛍光抗体法、生ケラチノサイト染色 (living keratinocyte staining)) いずれによっても、マウス又はヒトのrDsg3を認識するIgGを産生しなかった。これらの知見から、DSG3+/+野生型マウスはDsg3に対する免疫寛容を有しており、DSG3+/+野生型マウスにマウスDsg3に対する抗体を産生させる困難であることが示唆された。

【0034】

【表1】

マウス系統	n	抗原 ^a	CFA	IFA ^b	ELISA ^c		IIF ^d		生細胞染色 ^e	
					mDsg3	hDsg3	NMS	NHS	Pam	KU8
C57BL/6N	2	hDsg3	1	3	18.4	93.4	-	+	-	+
BALB/c	3	hDsg3	1	3	6.3	85.4	-	+	-	+
C3H/HeJ	2	hDsg3	1	3	47.5	167.7	-	+	-	+
C57BL/6N	3	mDsg3	1	7	10.6	10.1	-	-	-	-
BALB/c	3	mDsg3	1	7	1.7	2.3	-	-	-	-
C3H/HeJ	3	mDsg3	1	7	5.4	7.5	-	-	ND	ND

【0035】

表1中、抗原の欄には、組換えヒトDsg3を用いた場合は「hDsg3」、組換えマウスDsg3を用いた場合は「mDsg3」で示した(a)。「CFA」は、完全フロイント・アジュバント(CFA)を用いた精製マウスまたはヒト組換えDsg3の免疫回数を、また、「IFA」は、その後毎週行った、不完全フロイント・アジュバント(IFA)を用いた追加免疫(ブースト)の回数(3回または7回)を表す(b)。ELISAスコアはヒト組換えDsg3(hDsg3)またはマウス組換えDsg3(mDsg3)に対して算出した(c)。

20.0より大きければ陽性と判断される。表中の「IIF」は、マウス血清を用いて、正常マウス皮膚 (NMS) または正常ヒト皮膚 (NHS) の間接蛍光抗体染色 (IIF) を行った結果を示す (d)。また、表中の「生細胞染色」は、マウス血清を用いて、培養マウス・ケラチノサイト細胞株 (Pam) またはヒト・ケラチノサイト細胞株 (KU8) の生細胞染色を行った結果を示す (e)。「-」は陰性を、「+」は陽性を表す。「ND」は試験していないことを示す。

【0036】

【実施例3】 DSG3^{-/-}マウスおよびDSG3^{+/-}マウスにおけるマウスDsg3タンパク質の免疫

DSG3^{-/-}マウスは、雄DSG3^{-/-}マウスと雌DSG3^{+/-}マウスの交配により得た (Koch, P.J., et al., J. Cell Biol. 137:1091-1102 (1997))。また、B6.SJL-ptpr^cに10世代にわたり戻し交配させたRAG2^{-/-}マウスは、タコニック社 (Taconic) (German Town, NY) より入手した (Schulz, R.-J. et al., J. Immunol. 157:4379-4389 (1996))。

【0037】

DSG3^{-/-}マウスにはDsg3タンパク質に対する免疫寛容がないことを確認するため、DSG3^{-/-}マウスをマウスrDsg3で免疫し、マウスrDsg3に対するELISAスコアを測定した。

【0038】

DSG3^{-/-}マウス及びDSG3^{+/-}マウスを、完全フロイント・アジュバントを用いて、5 μ gの精製マウスrDsg3で感作し (0日目)、その後、8、15、22、および28日目に、不完全フロイント・アジュバントを用いて、マウスrDsg3で追加免疫した。抗体産生は、マウスrDsg3をコーティング用抗原として用いて、実施例2と同様のELISAにより測定した。

【0039】

DSG3^{-/-}マウス (n=4) では、早くも11日目に抗Dsg3 IgGの産生が観察され、その後その力価は増加し続けた (図1A)。DSG3^{+/-}マウスを繰り返し免疫すると、最終的にはELISA力価が増加したが、その力価は32日目のDSG3^{-/-}マウスの力価より有意に低かった (p<0.0001)。

【0040】

これらのマウスで産生された抗Dsg3 IgGが、インビボでケラチノサイト上のDsg3タンパク質に結合することができるか否かを決定するため、マウス・ケラチノサイト細胞株Pam212を用いて実施例2と同様に生体染色を行った。DSG3^{-/-}マウス由来の血清を培養培地に添加すると、それらの血清は培養ケラチノサイトの細胞間接着部位に結合したが、DSG3^{+/-}マウス由来の血清は細胞表面の染色を全く示さなかった(図1B)。免疫されたDSG3^{+/-}マウスの表皮にはインビボのIgG沈着は見られなかった。従って、DSG3^{+/-}マウスで産生された抗体は、精製マウスrDsg3中の微量混入成分、マウスrDsg3のC末端のタグ、又はインビボの条件では到達できないマスキングされたDsg3エピトープに対して産生されたものである可能性が極めて高い。

【0041】

これらの結果から、DSG3^{-/-}マウスにはDsg3に対する免疫寛容がなく、マウスrDsg3でDSG3^{-/-}マウスを免疫することにより、Dsg3の接着機能を阻害する病原性IgGが産生されることが示唆された。

【0042】

【実施例4】 受容RAG2^{-/-}マウスにおける病原性抗Dsg3 IgGの永続的な産生

DSG3^{-/-}マウスは標的抗原を欠損しているため、DSG3^{-/-}マウスでは抗Dsg3 IgGにより表現型が変化しないと予想された。そこで、免疫されたDSG3^{-/-}マウス又はDSG3^{+/-}マウスの脾細胞をRAG2^{-/-}免疫不全マウスに移入する実験を行った。RAG2^{-/-}マウスは、Dsg3タンパク質を発現しているが、T細胞レセプター又は免疫グロブリンの遺伝子を再編成することができないため、これらのマウスには成熟T又はB細胞が存在しない。そのため、移入した脾細胞が拒絶されず、受容マウスで抗Dsg3 IgGが産生されると考えられる。

【0043】

DSG3^{-/-}マウス及びDSG3^{+/-}マウスを、完全フロイント・アジュバントを用いて、5 μ gの精製マウスrDsg3で感作し(0日目)、その後、7日目及び14日目に、不完全フロイント・アジュバントを用いて、マウスrDsg3で追加免疫した。抗体産生は、18日目に実施例2と同様のELISAにより確認した。21日目に、アジュバン

トを用いずにマウスrDsg3で追加免疫した。追加免疫の4日後に、脾細胞を調製するためマウスを屠殺した。

【0044】

脾細胞の養子移入にあたっては、単核細胞を、DSG3^{-/-}マウス又はDSG3^{+/-}マウスの脾臓から単離し、10%ウシ胎児血清、0.21%重炭酸ナトリウム溶液 (w/v)、2mM L-グルタミン (GIBCO)、及び抗生物質を含む完全培地RPMI1640 (Nissui Pharmaceuticals, Tokyo) に再懸濁させた。約 1×10^7 個の脾細胞をPBSに懸濁させ、尾静脈への静脈注射によりRAG2^{-/-}マウスに移入した。抗体産生は、マウスrDsg3をコーティング用抗原として用いて、実施例2と同様のELISAにより測定した。

【0045】

DSG3^{-/-}脾細胞を移入してから早くも4日目には受容RAG2^{-/-}マウスの血中に抗Dsg3 IgGが検出された。抗体産生は迅速に増加し、21日目付近でプラトーに達し、その後永続的に持続した (n=13) (図2A)。持続的な抗体産生は、6ヶ月以上にわたり、マウスが生存している限り観察された。対照的に、DSG3^{+/-}マウス脾細胞を移入されたRAG2^{-/-}マウスの血中には、いずれの時点においても抗Dsg3 IgGが検出されなかった (n=5) (図2A)。

【0046】

抗Dsg3 IgG産生B細胞の局在を調べるため、以下のようにしてELISPOTアッセイを行った。PVDF底96穴マイクロタイター・プレート (Millipore-Amicon, Beverly, MA) を、30 μ g/mlのマウスrDsg3でコーティングした。再構築されたRAG2^{-/-}マウスの末梢血、脾臓、骨髓、及びリンパ節から調製された単核細胞を、37℃で、5%CO₂を含む加湿空気中で、4時間、プレート上でインキュベートした。アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgG抗体 (Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA) を用いて、メンブレンに結合したIgGをスポットとして可視化した。スポットの数を実体顕微鏡下で計数し、抗mDsg3 IgG産生B細胞の頻度を、単核細胞 10^5 個当たりの数として決定した。全ての実験はトリプリケートで行った。アッセイの結果検出された、抗Dsg3 IgG産生B細胞の数を表2に示す。

【0047】

抗Dsg3 IgG産生B細胞は、養子移入の初期（22日目）にも後期（117日目）にも受容RAG2-/-マウスの脾臓及びリンパ節に主に局在していることが判明した（表2）。表中、免疫されたDSG3-/-マウスの脾細胞を移入されたRAG2-/-マウスは「+」で、移入されていないマウスは「-」で表した(a)。また、「日数」は移入から屠殺までの日数を表す(b)。また、抗mDsg3 IgG産生B細胞の数は、単核細胞 10^5 個当たりの数として示されている(c)。脾臓における抗Dsg3 IgG産生B細胞の頻度は、単核細胞 10^5 個当たり20から100個の範囲であった。

【0048】

【表2】

マウス	移入 ^a	日数 ^b	脾臓	リンパ節	骨髄	PBMC
RAG#466	-	-	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
RAG#514	+	22	86.5±29.9	13.5±13.6	0.0±0.0	3.8±5.4
RAG#212	+	33	102.1±14.7	47.8±8.8	0.0±0.0	0.0±0.0
RAG#134	+	117	20.8±5.9	16.5±5.9	2.1±2.9	0.0±0.0
RAG#135	+	117	31.3±8.8	27.1±2.9	0.0±0.0	0.0±0.0

【0049】

【実施例5】 免疫されたDSG3-/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスは尋常性天疱瘡の表現型を発現した

免疫されたDSG3-/-脾細胞をもつ受容RAG2-/-マウスにおいて最初に認められた症状として、養子移入の7～14日後付近で、DSG3+/-脾細胞をもつマウス（n=5）と比較して体重減少が認められた（n=13）（図2B及び3A）。その後、これらのマウスでは体重が減少し続け、数匹は実際に死亡した。これらのマウスのうち生き残ったものは、後に体重を増やし始めた（図2B）。体重減少の表現型は、調べたRAG2受容-/-マウス全てに観察された（n=13）。受容RAG2-/-マウスのうちの数匹（n=5）は、掻破を通常行う部位である鼻周辺の皮膚に痂皮のあるびらんを発症した（図3B）。

【0050】

表皮（図3G、鼻周辺）、口腔粘膜（図3F、硬口蓋）、及び食道粘膜を含め、受容RAG2-/-マウスの重層扁平上皮のケラチノサイト細胞表面には、インビボのIgG沈着が見られた。数層のケラチノサイトが見られる表皮では、IgG沈着は下方の層に限定されていたが（図3G）、口腔及び食道の上皮では上皮全層にIgGが見られた（図3F）。これらのマウスにおいて、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、小腸、及び大腸を含む他の組織にはIgG沈着が見られなかった。免疫されたDSG3-/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスにおける組織診により、頬粘膜、硬口蓋（図3C）、口腔咽頭領域、及び食道上部（図3D）に、基底層直上の上皮内分裂、即ち、典型的な尋常性天疱瘡所見である基底層直上の棘融解が示された。水疱形成の初期病巣には、有意な炎症細胞浸潤物は本質的に見られなかった（図3C）。炎症性浸潤物は、古いびらん病巣に主に認められた（図3E）。そこでは、上皮の障壁機能の消失により食物による刺激及び急性炎症が二次的に引き起こされていた。これらの損傷が、おそらく、これらのマウスの成長障害をもたらす程に食物摂取を減少させたものと考えられる。

【0051】

対照的に、免疫されたDSG3+/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスには、表現型の変化または病理学的な変化は認められなかった。これらの知見から、免疫されたDSG3-/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスは、尋常性天疱瘡の表現型を発現することが示された。

【0052】

〔実施例6〕 免疫されたDSG3-/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスは、脱毛表現型を示した

養子移入の15～25日後付近に、13匹のRAG2-/-マウスのうち11匹において、部分的な脱毛が認められた（図2A、矢印参照、図4A、B）。典型的には、脱毛は小さなスポットとして発生し、次の2から3週間で次第に周囲へと拡大した。受容RAG2-/-マウスが12週齢以下のとき、額で脱毛が開始し、後方へと進展した。数匹のマウスにおいては、脱毛斑に新たな毛がモザイク状に再生したが、脱毛斑が同スポットとして1ヶ月以上残存したマウスや、明確な脱毛斑を形成せずに脱毛が広がったマウスもいた（図4D）。脱毛斑の隣接領域に粘着テープを貼付し、

それを剥離すると（ヘア・プル・テスト（hair pull test））（Koch, P.J., et al., J. Cell Sci. 111:2529-2537 (1998)）、毛が塊となりテープに付着した（図4C）。これらの表現型は、6ヶ月以上にわたり、血中抗Dsg3 IgGが存在する限り持続した。

【0053】

RAG2-/-受容マウスの皮膚の生検により、毛球部（hair club）周辺のケラチノサイトの細胞表面に強いIgG沈着が示された（図4G、H）。毛包のIgG結合の強度は、表皮よりもはるかに大きかった（図4G）。皮膚の組織診により、休止期の毛球部周辺の細胞と外毛根鞘の基底層との間の棘融解が示された（図4E、H、矢印）。脱毛斑には、休止期毛の消失と一致して、空の膨張した休止期毛包が存在した（図4F）。損傷のない表層の表皮には明白な棘融解はなかった。棘融解を起こした毛包の周辺に、明らかな炎症細胞浸潤は認められなかった（図4E、F）。

対照的に、DSG3+/-脾細胞を移入されたRAG2-/-マウスは、いずれの時点においても、脱毛斑を示さなかった。

【0054】

【発明の効果】

このモデルの開発により、組織特異的な自己免疫疾患（標的抗原と傷害を起こす抗体あるいはT細胞の関係が明快になっている自己免疫疾患）に関する研究の新たな方向性が開かれた。本発明のモデルは、特に養子移入の前にリンパ球を操作することにより、自己免疫疾患の抗原タンパク質に対する抗体産生や細胞障害性T細胞の誘導などの細胞メカニズムを解明するために有用である。また、このモデルは、新規な疾患特異的な治療法の開発のための貴重な道具ともなる。本発明の尋常性天疱瘡モデル動物においては、主要な表現型が体重減少及び可逆的な脱毛であるため、屠殺することなくマウスを観察することにより、疾患の活性をモニターすることができる。血中抗Dsg3抗体のELISA力価も、疾患の活性の客観的な指標である。さらに、表現型は、6ヶ月以上にわたり持続する。従って、それぞれの治療法の有効性を容易に、客観的に評価することができる。さらに重要なことには、本発明の方法は、標的抗原が同定されている、他の組織特異的自己免疫疾患の活性疾患マウスモデルを開発するために応用できる。

【 0 0 5 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Keio University

<120> Methods for development of an active disease
animal model for autoimmune diseases

<130> KUV-101

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 1

ccgagatctc ctataaatat gacctgcctc ttccctaga

39

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 2

cgggtcgacc ctccaggatg actccccata

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

DSG3-/-マウスにおける、インビボで結合できる抗Dsg3 IgGの産生を示す図である。(A) DSG3-/-マウス及びその+/-同腹マウスをマウスrDsg3で免疫し、抗Dsg3 IgGの力価を経時的にELISAで測定した。矢印は、完全フロイント・アジュバントを用いたマウスrDsg3による最初の免疫を示し、矢尻は不完全フロイント・アジュバント用いたマウスrDsg3による追加免疫を示す。DSG3-/-マウスは、+/-同腹マウスよりもはるかに効率よく抗Dsg3 IgGを産生した。(B) 免疫されたDSG3-/-マウス (a) 由来の血清により、培養ケラチノサイトの細胞間接触部位が染色されたが、+/-同腹マウス (b) 由来の血清では染色されなかった。バーは50 μ mを表す。

【図 2】

免疫されたDSG3-/-脾細胞の移入後、受容RAG2-/-マウスにおいて抗Dsg3 IgGが産生されたことを示す図である。(A) 免疫されたDSG3-/-マウスの脾細胞を受容したRAG2-/-マウス [RAG2-/(DSG3-/-)] 又はDSG3+/-マウスの脾細胞を受容したRAG2-/-マウス [RAG2-/(DSG3+/-)] で、マウスrDsg3に対するELISAスコアを得た。DSG3-/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスは、持続的な抗Dsg3 IgG産生を示した。

矢印は、脱毛表現型が出現した日を示す。対照的に、DSG3+/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスに関するELISAは、いずれの時点においても陰性のままであった。(B) 受容RAG2-/-マウスの体重変化を経時的にプロットした。DSG3-/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスでは、10~14日目に、DSG3+/-脾細胞をもつマウスと比較して体重増加が遅れ始め、その後体重が減少し続けた。数匹は死亡し(†)、数匹は生き残り、その後体重を増やした。

【図3】

免疫されたDSG3-/-脾細胞を移入されたRAG2-/-マウスは、尋常性天疱瘡の表現が見られたことを示す図である。脾細胞の移入の7~14日後付近に、DSG3-/-脾細胞をもつRAG2-/-マウス(A、下)では、DSG3+/-脾細胞をもつマウス(A、上)と比較して体重減少が認められた。数匹は、マウスが掻破する鼻及び頬の周辺に、痂皮のあるびらんを発症した(B)。DSG3-/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスの組織診により、粘膜上皮の基底層直上に表皮内水疱形成が明らかになった(C、硬口蓋；D、食道上部)。びらん病巣の下には炎症性浸潤物が認められた(E、食道上部)。直接蛍光抗体法により、粘膜上皮(F、硬口蓋)及び皮膚(G、鼻周辺)に、ケラチノサイト細胞表面上のインビボのIgG沈着が認められた(図の白い部分)。バーは50 μ mを示す。

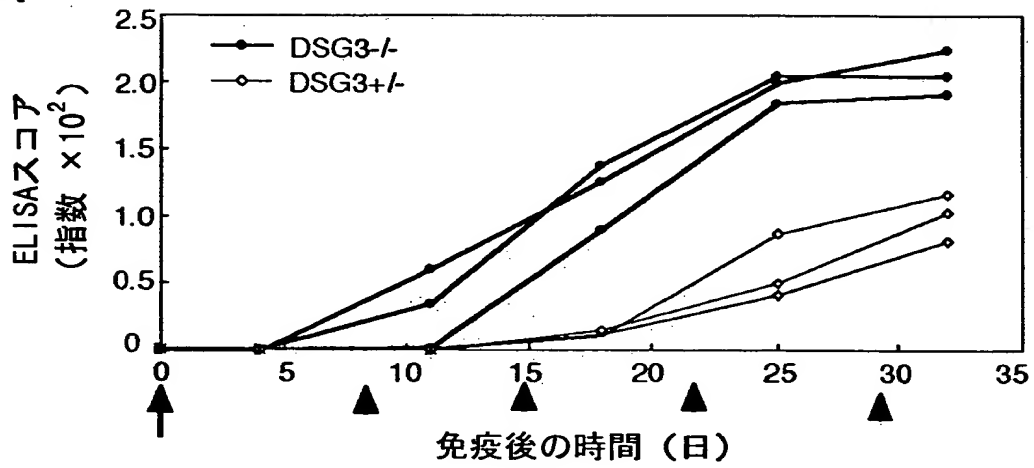
【図4】

免疫されたDSG3-/-脾細胞を移入されたRAG2-/-マウスは、DSG3-/-マウスに見られるのと同様な、脱毛表現型が見られたことを示す図である。移入の15~25日後付近に、DSG3-/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスは部分的な脱毛を示した(A、B)。粘着テープによるヘア・プル・テストで、DSG3-/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスでは毛の集塊がテープに付着したが(C、左)、DSG3+/-脾細胞をもつRAG2-/-マウスでは毛が付着しないことが示された(C、右)。その後、無毛領域に新たな毛がモザイク状に再生した(D、矢印)。組織診により、毛球部の細胞と、外毛根鞘上皮の基底層との間の棘融解(E、矢印)、及び空の膨張した休止期毛包(F、矢印)が示された。直接蛍光抗体法、毛根部のケラチノサイトの細胞表面にはインビボのIgG沈着が見られた(G、H)(図の白い部分)。バーは50 μ mを示す。

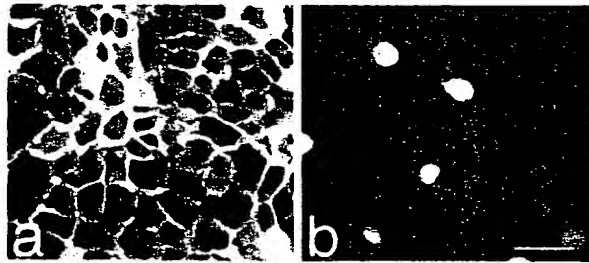
【書類名】 図面

【図 1】

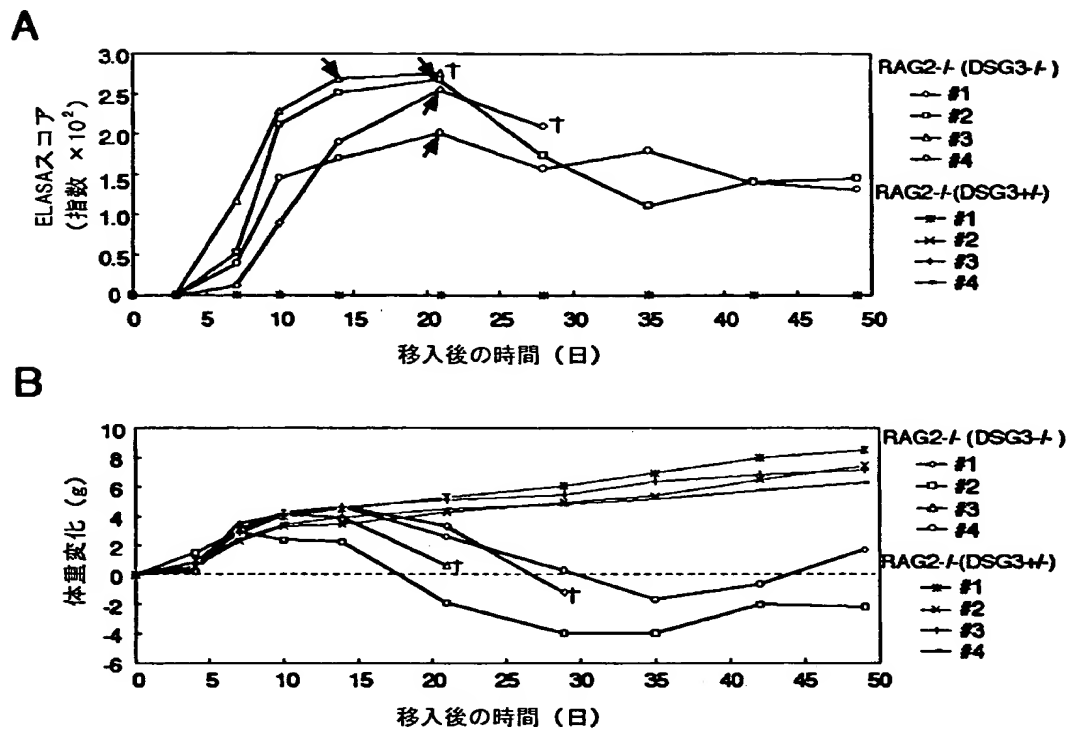
A



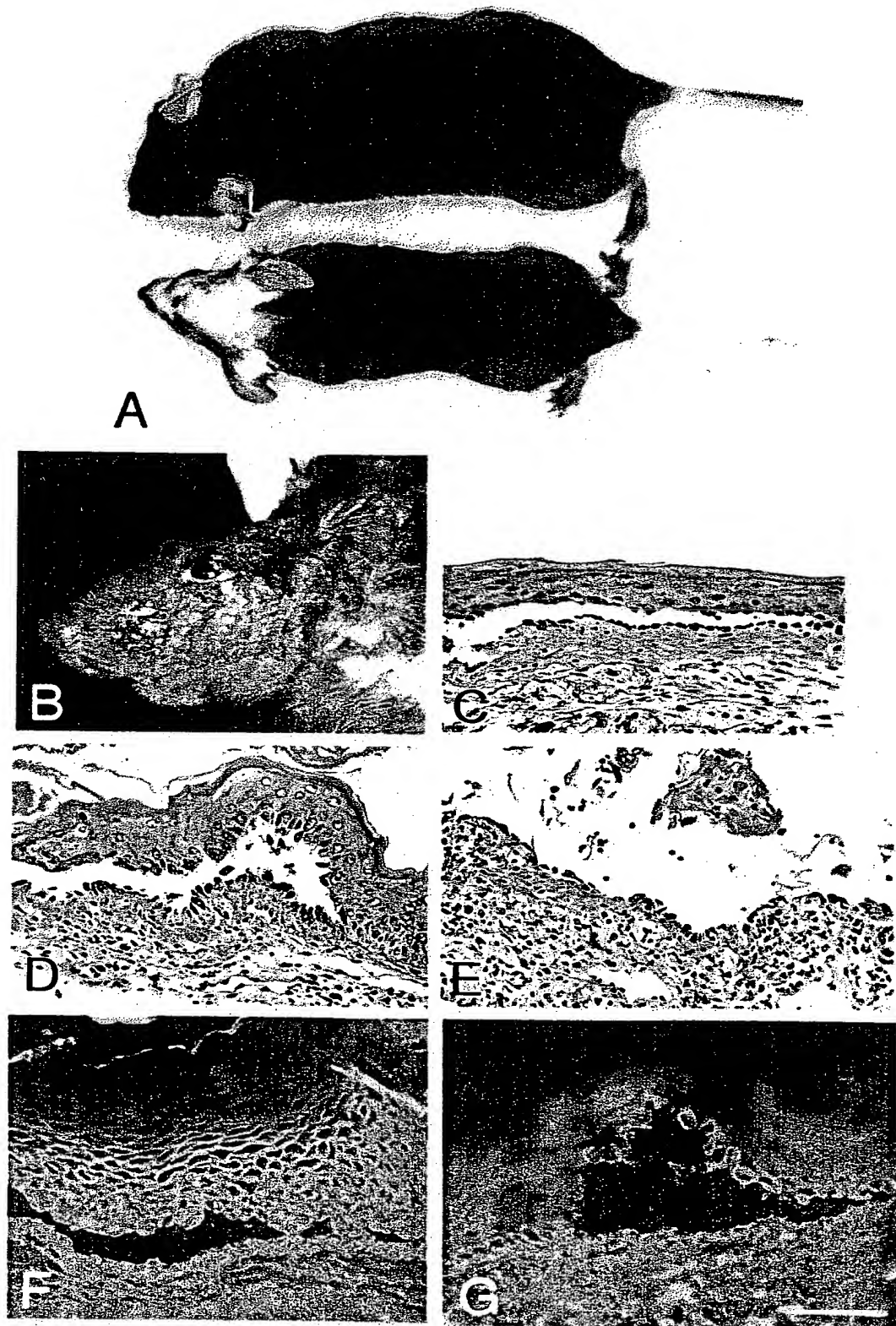
B



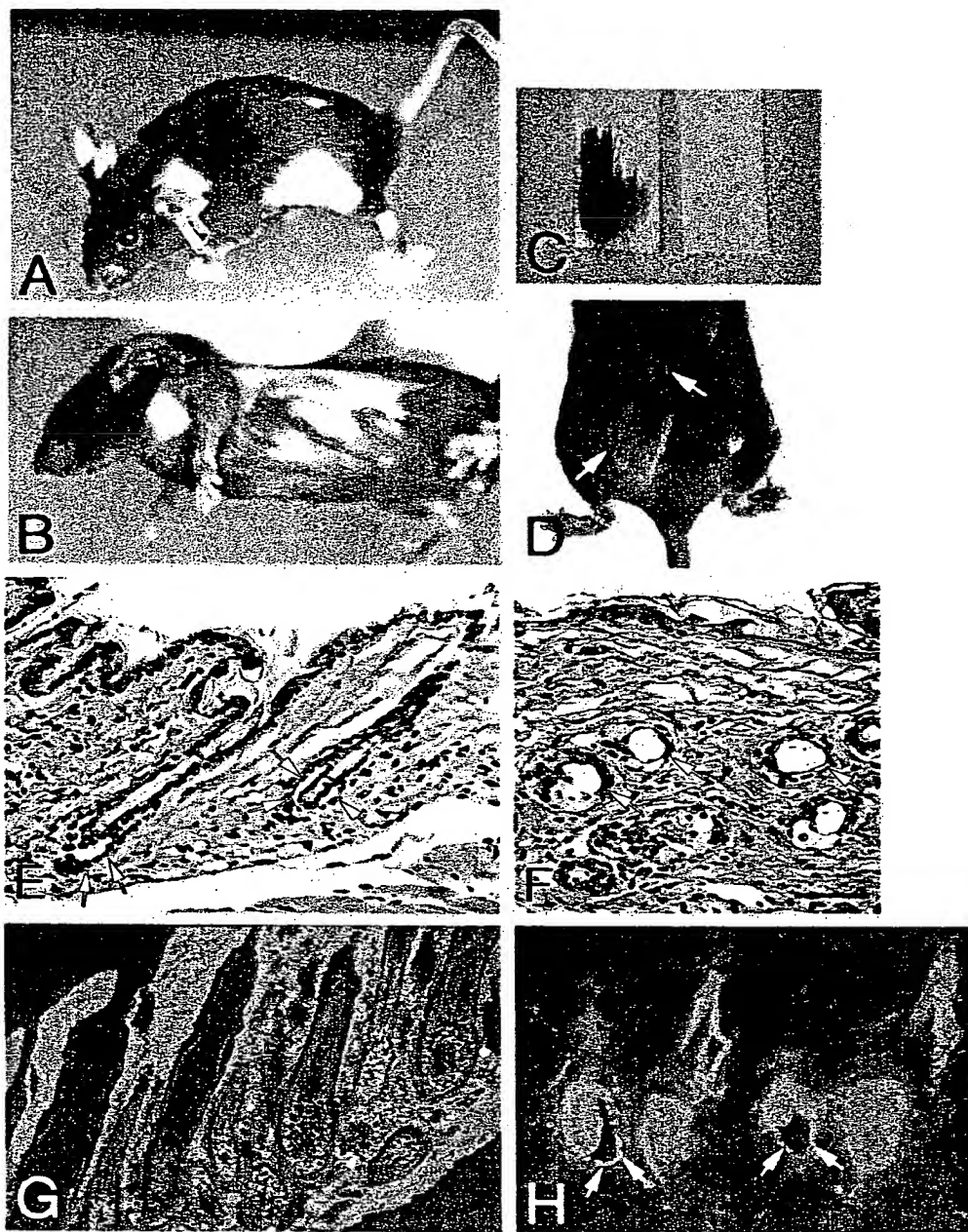
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 自己免疫疾患のモデル動物およびその作製方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 尋常性天疱瘡（PV）は、デスモグレイン3（Dsg3）に対する抗体により引き起こされる致命的となりうる皮膚及び粘膜の自己免疫疾患である。rDsg3で免疫したDSG3-/-マウスの脾細胞を、Dsg3タンパク質を発現するRAG2-/-免疫不全マウスへと養子移入すると、永続的な抗Dsg3 IgGの産生が起こった。このような血中IgGは、インビボでDsg3タンパク質に結合し、ケラチノサイトの細胞間接着の破壊を引き起こし、口腔粘膜内の水疱形成及び休止期毛の消失を含む、尋常性天疱瘡表現型をもたらした。これは、6ヶ月以上にわたり持続した。本発明の方法を利用すれば、種々の自己免疫疾患に関する活性疾患動物モデルを作製することが可能である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598121341]

1. 変更年月日 1998年 9月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区三田二丁目15番45号

氏 名 学校法人慶應義塾

THIS PAGE BLANK (USPTO)